

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720061152135

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于生物柴油制备的海洋高脂微藻筛选

Screen of High-lipid Content Marine Microalgae Strains

Based on Preparation of Biodiesel

余 杨

指导教师姓名: 高亚辉 教授

专 业 名 称: 水生生物学

论文提交日期: 2009 年 04 月

论文答辩时间: 2009 年 05 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	I
第一章 前言	1
1.1 生物柴油概述	1
1.2 微藻生物柴油	8
1.3 环境因子对微藻脂类积累的影响	13
1.4 本论文研究的目的和意义	19
第二章 材料与方法	21
2.1 藻种来源及培养	21
2.2 主要仪器与试剂	22
2.3 藻细胞油脂含量测定方法	24
2.4 优化 Nile Red 荧光染色法	24
2.5 筛选高脂微藻	25
2.6 高脂微藻的诱变育种	26
2.7 培养条件对高脂微藻生长和脂类含量的影响研究	27
2.8 固定化培养研究	28
2.9 利用藻类油脂制备生物柴油	29
第三章 结果	30
3.1 藻种分离鉴定	30
3.2 Nile Red 荧光染色法的优化	35
3.3 藻株总脂含量	39
3.4 高脂微藻的筛选	40
3.5 高脂微藻的紫外诱变	41
3.6 培养条件对高脂微藻生长和脂类含量的影响	44

3.7 底栖硅藻固定化培养	51
3.8 利用藻类油脂制备生物柴油	53
第四章 讨论	54
4.1 高脂微藻的筛选	54
4.2 Nile Red 荧光染色法	55
4.3 高脂微藻的诱变	56
4.4 微藻生长及油脂含量的影响因素研究	57
4.5 底栖硅藻固定化培养	60
4.6 微藻生物柴油制备	61
第五章 总结与展望	63
5.1 总结	63
5.2 展望	63
参考文献	65
攻读硕士期间发表的论文和参加的课题	72
致 谢	73

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	III
Chapter1 Preface	1
1.1 Development and utilization of biodiesel	1
1.2 Microalgae biodiesel	8
1.3 Effects of different factors on lipid accumulation of microalgae	13
1.4 Purpose and significance of this study	19
Chapter 2 Materials and Methods	21
2.1 Source of microalgae strains	21
2.2 Main reagent and instruments	22
2.3 Determination of lipid content in microalgae	24
2.4 Optimization of the Nile red fluorescence method	24
2.5 Screen of high-lipid content microalgal strains	25
2.6 Mutation of high-lipid content microalga	26
2.7 Effects of different culture conditions on the growth and lipid content of high-lipid content	27
2.8 Immobilization culture	28
2.9 Preparation of biodiesel from microalgal oil	29
Chapter 3 Results	30
3.1 Identification of isolated microalgae strains	30
3.2 Optimization of the Nile red fluorescence method	35
3.3 Determination of lipid content in microalgae strains	39
3.4 Screen of high-lipid content microalgal strains	40
3.5 Mutation of high-lipid content microalga	41
3.6 Effects of different culture conditions on the growth and lipid content of	

high-lipid content microalgae	44
3.7 Immobilization culture of benthic diatoms.....	51
3.8 Preparation of biodiesel from microalagal oil	53
Chapter 4 Discussion	54
4.1 Screen of high-lipid content microalgae strains	54
4.2 Nile red fluorescence method	55
4.3 Mutation of high-lipid content microalage	56
4.4 Effects of different culture conditions on the growth and lipid content of high-lipid content microalgae	57
4.5 Immobilization culture of benthic diatoms.....	60
4.6 Preparation of biodiesel from microalagal oil	61
Chapter 5 Conclusion and Prospect	63
5.1 Conclusion	63
5.2 Prospect.....	63
References	65
List of publications and participated reseach projects	72
Acknowledgements	73

摘要

生物能源的开发利用是缓解全球能源压力，保障能源安全的重要途径。其中生物柴油以其较高的可持续性和清洁无污染的特点成为全球关注的焦点。微藻具有油脂含量高，生物量大，生长周期短，易培养等特点，是制备生物柴油的良好资源。本研究旨在通过筛选藻种和诱变选育获得脂类含量高，生长快的微藻，并优化培养条件和培养方式，为微藻生物柴油的大规模生产提供理论基础和技术支持。

主要研究结果如下：

1) 研究表明，对实验室现有藻种和野外采集到的四种底栖硅藻进行总脂含量测定，筛选获得了如下高脂微藻：三角褐指藻 (*Pheodactylum tricornutum*)，总脂含量 34.4%；牟氏角毛藻 (*Chaetoceros muelleri*)，总脂含量 25.1%；旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*)，总脂含量 24.2%；假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*)，总脂含量 24.3%；盐生舟形藻 (*Navicula halophila*)，总脂含量 39.1%；碎片菱形藻共生变种 (*Nitzschia frustulum* var. *symbiotica*)，总脂含量 35.7%。其中，两种底栖油泥硅藻，盐生舟形藻和碎片菱形藻共生变种总脂含量较高。

2) 以 Nile Red 为染料，对假微型海链藻进行荧光染色并测定荧光强度，通过对比标准物得出油脂含量。优化后的最佳染色条件为 Nile Red 浓度 0.5 μ g/mL，染色时间 10min，染色温度 40 $^{\circ}$ C，藻液 OD₆₈₀ 的范围为 0.1~0.4。结果表明，优化后的方法可准确测定假微型海链藻和牟氏角毛藻的中性脂含量，但对三角褐指藻效果不佳。

3) 采用紫外线照射法对假微型海链藻进行诱变处理，分别通过 Nile Red 荧光法和油脂提取称重法完成初筛和复筛。获得的 7 株突变株中，HL-1 突变株的总脂含量比出发株提高原含量的 19.3%，生长速率低于出发株，但生物量高于出发株。

4) 在此基础上，通过正交试验，发现了两种微藻的最适生长条件和最适产油条件。其中，三角褐指藻的最适生长和产脂条件分别为光照 4500lx，温度 17 $^{\circ}$ C，NO₃⁻浓度 2mmol/L，EDTA-Fe 浓度 10⁻⁴mmol/L 和光照 3000lx，温度 22 $^{\circ}$ C，NO₃⁻

浓度 0.5mmol/L, EDTA-Fe 浓度 10^{-6} mmol/L。牟氏角毛藻的最适生长和最适产脂条件分别为光照 6000lx, 温度 27℃, NO_3^- 浓度 2mmol/L, EDTA-Fe 浓度 10^{-6} mmol/L 和光照 3000lx, 温度 17℃, NO_3^- 浓度 1mmol/L, EDTA-Fe 浓度 10^{-5} mmol/L。

5) 以从各种高脂微藻中提取的油脂作为原材料, 制备生物柴油, 产量为干重的 5.6~15.3%。其中, 盐生舟形藻和碎片菱形藻共生变种的生物柴油产量高于另三株高脂硅藻, 分别为 15.3%和 14.3%。

关键词: 微藻; 筛选; 脂类; 诱变; 生物柴油

Abstract

The development and utilization of bio-energy is an important way to relieve the pressure of global energy shortage. Biodiesel can be a focus of the bio-energy, because it is a cleaner-burning and renewable fuel. Microalgae have been considered to be a ideal source of biodiesel for its high growth rate and high lipid content. The purpose of this paper is getting high-lipid microalgae strains with high growth rate by screen and random mutagenesis. After that, culture conditions and cultivation methods are optimized for large-scale production. The main results were shown as follow:

1) Six species of high-lipid content microalgae were selected, as candidates of source of microalgal biodiesel, by algal species collection in field and determination of lipid contents of strains preserve in Diatom Lab, Xiamen University. These six species and their lipid contents were: *Pheaodactylum tricornutum*, 34.4%; *Chaetoceros muelleri*, 25.1%; *Chaetoceros curvisetus*, 24.2%; *Thalassiosira pseudonana*, 24.3%; *Navicula halophila*, 39.1%; *Nitzschia frustulum* var. *Symbiotica*, 35.7%. Among the microalgae determined, benthic diatoms are very high in lipid content

2) Evaluate neutral lipid content in *Thalassiosira pseudonana* using Nile Red fluorescence method. After optimization, 0.5 μ g/mL was selected as the optimum dye concentration, 10 min and 40 $^{\circ}$ C was selected as the optimum staining time and temperature, respectively. The optimum concentration range of microalgae was between OD₆₈₀ 0.1~0.4. The method and a conventional gravimetric determination method provided similar results on replicate samples of *Thalassiosira pseudonana* and *Chaetoceros muelleri*. But this method has been unsuccessful in *Pheaodactylum tricornutum*

3) Seven mutant strains of *Thalassiosira pseudonana* were isolated for their high lipid content after ultraviolet radiation. Lipid contents were determined by Nile Red fluorescence method and conventional gravimetric determination method in the first

round and second screen, respectively. HL-1, which has the highest lipid content among seven mutants, has 19.3% more lipid content than starting strain. However, the growth rate of HL-1 was lower than starting strain while biomass of HL-1 was higher than starting strain

4) Orthogonal test was designed to find out the optimum conditions for growth and lipid accumulation of *Pheodactylum tricornutum* and *Chaetoceros curvisetus*. The results show, light intensity 4500 lx, 17°C, NO₃⁻ concentration 2mmol/L, EDTA-Fe concentration 10⁻⁴mmol/L is the best condition for growth of *P. tricornutum*, when the best condition for lipid accumulation is light intensity 3000lx, 22°C, NO₃⁻ concentration 0.5mmol/L, 10⁻⁶mmol/L. And the best conditions for growth of *C. curvisetus* is light intensity 6000lx, 27°C, NO₃⁻ concentration 2mmol/L, EDTA-Fe concentration 10⁻⁶mmol/L, when the best condition for lipid accumulation is light intensity 3000lx, 17°C, NO₃⁻ concentration 1mmol/L, EDTA-Fe concentration 10⁻⁵mmol/L

5) Biodiesel was produced with oil extract from different microalgae species, the biodiesel yield is 5.6~15.3%(dry weight). Two benthic diatom can yield more biodiesel than other species. The yield of biodiesel can reach 15.3% and 14.3% in *Navicula halophila* and *Nitzschia frustulum* var. *symbiotica*, respectively

Key words: microalgae; screen; lipid; mutagenesis; biodiesel

第一章 前言

1.1 生物柴油概述

1.1.1 新能源 生物能源

随着全球经济一体化的不断发展,石油作为战略资源已成为世界各国能源经济的最主要内容。自 20 世纪70 年代能源危机以来,人们越来越清楚地认识到传统化石能源资源的开发和利用正面临着严峻的形势。根据现在的全球化石能源的消费速度以及对石油、煤炭、天然气的贮量和开采时限进行估算与推测,石油还可以持续开采41年,天然气为54年,煤炭为155年 (Goldemberg, 2007)。尽管还会有新的油气田被发现,而且开采技术也在不断进步,但石油和天然气将在21世纪中叶趋于枯竭 (孙晓仁等, 2004)。发展替代能源是保障能源安全的重大战略举措。

我国目前是世界上第二大能源消费国,由于人口众多、能源利用效率低、能源结构不合理和能源生产隐性成本高等问题,能源问题现已极其严峻。自1993年我国成为石油进口国以来,每年石油进口量以4%的速度递增,这使我国石油对外依存度从1995年的7.6%增加到2000年的33.8% (蒋剑春等, 2006)。预计2010年,我国的原油加工量将达到2.7亿t,但原油的产量却不超过1.7亿t (谭天伟等, 2003)。Ragauskas 等 (2006) 就指出,到2050年,能源的需求将比现在增加50%。能源匮乏,甚至是能源危机,与能源需求增长之间的矛盾已经成为影响人类社会发展的重大难题。

随着人们环保意识的提高,环境保护越来越受到人们的重视。化石燃料的消费对环境造成了严重的污染。据统计,空气中的CO₂、硫化物和颗粒悬浮物约70%来自化石燃料燃烧的排放物。近年来,我国大量消耗化石燃料,使大气中CO₂、硫化物和颗粒悬浮物含量急剧增加。有资料报道,我国每年排放二氧化硫1600万吨,二氧化碳15~20亿吨,烟尘1400多万吨。以上污染给我国造成的经济损失每年达1000亿元以上 (谭天伟等, 2003)。

毋庸置疑,这些变化已经对人类和其它生物赖以生存的地球生态环境造成了极大威胁,环境保护成为人类又一迫切需要解决的难题。能源短缺和环境污染已

经成为目前人类社会所面临的巨大挑战。为了维持各自国家经济的可持续发展,许多国家政府正大力开发化石能源的替代产品。

生物能源是利用生物可再生原料及太阳能而生产的能源,如燃料酒精、生物柴油、生物质颗粒燃料等。生物能源作为一种新能源的开发利用,可以缓解我国能源供应紧张的状况,并对国家能源安全起到重要作用。同时,由于生物能源的含氧量高,燃烧过程比较完全,能够有效减少污染物排放量,对环境恶化起到抑制作用。

近年来,生物能源的开发利用已引起世界各国政府和科学家的关注,各国经过长期的研究与开发,已形成了各具特色的生物能源研究与开发体系,如日本的阳光计划、印度的绿色能源工程、美国的能源农场和巴西的酒精能源计划等(Gross *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2000)。目前,我国对生物能源的研究与应用也正在积极的开展。

1.1.2 生物柴油的基本性质

生物柴油(Biodiesel),是指以油料作物、野生油料作物和工程微藻等水生植物油脂,以及动物油脂、废餐饮油等为原料油通过酯交换反应(Transesterification reaction)工艺制成的甲酯或乙酯燃料。作为可替代石化柴油的清洁生物燃料,生物柴油的使用性能与现用石化柴油基本相当,且具有良好的环境特性和可生物降解性,具有广阔的发展前景。

生物柴油主要是由C, H, O三种元素组成。其主要成分是软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等长链饱和或不饱和脂肪酸同甲醇或乙醇等醇类物质所形成的酯类化合物。

根据研究,作为柴油替代品的理想物质应当有如下的分子结构(盛梅等, 2004):

- 1) 拥有较长的碳直链。
- 2) 双键的数目应尽可能要少,最好只有一个双键。并且双键位于碳分子链的末端或者是均匀分布在碳分子链中。
- 3) 含有一定量的氧元素,最好是酯类、醚类、醇类化合物。
- 4) 分子结构尽可能没有或只有很少的碳支链。
- 5) 分子中不含有芳香烃结构。

原因在于：碳链较长，可以保证有比较高的沸点，不易挥发，有利于安全储存、运输和使用，但碳链过长，则会使熔点过高，而导致流动性和低温性能变差，一般认为16-19个碳比较合适；含有双键可以保证在常温保持液体状态，增加流动性，特别是低温流动性，保证了作为燃料使用的必要条件；双键过多会使物质不稳定，且燃烧不完全，影响作为燃料使用的适用性；双键位于分子链的末端或均匀分布，可以使该物质的抗爆性增加，并且易于点燃；没有碳支链的存在可以使其易于氧化，保证燃烧充分，不会产生碳沉积而堵塞燃料的喷嘴；没有芳香烃结构的存在，可以保证充分燃烧，不会产生炭黑；长碳链结构还可以使生物柴油能以任何比例与矿物柴油相混合。因此，一般将理想的柴油替代品的分子式表示为： $C_{19}H_{36}O_2$ ，并具有如下所示的分子结构：



可以看出生物柴油的分子结构基本上与理想的柴油替代品的分子结构相类似。因此，从理论上讲，生物柴油具有代替矿物柴油使用的可能性。

1.1.3 生物柴油的优势和缺点

生物柴油具有较好的低温发动起动机性能，无添加剂凝固点达 $-20^{\circ}C$ ；具有较好的润滑性能，使喷油泵，发动机缸体和连杆的磨损降低；高十六烷值使生物柴油的燃烧性能好于石油柴油，燃烧残留物呈微酸性使催化剂和发动机机油的使用寿命延长。

由于闪点高，生物柴油不属于危险品。因此，在运输、储存、使用方面的优势是显而易见的。在环保方面，生物柴油含硫量低，所以燃用生物柴油产生的 SO_2 的排放量比燃用化石柴油低很多，在很大程度上避免了酸雨的形成；生物柴油的燃烧残炭低，也不含有对环境会造成污染的芳香族烷烃，因而废气对人体损害低于柴油。检测表明，与石油柴油相比，使用生物柴油可降低90%的空气毒性，在一定程度上降低因环境污染造成的患癌率；生物柴油含氧量高，燃烧时排烟少，其中一氧化碳的排放与石油柴油相比减少约10%。

生物柴油的优良性能使得采用生物柴油的发动机废气排放指标不仅满足目前的欧洲II号标准，甚至满足随后即将在欧洲颁布实施的更加严格的欧洲III号排放标准。而且由于生物柴油燃烧时排放的二氧化碳远低于该植物生长过程中所吸收的二氧化碳，从而改善由于二氧化碳的排放而导致的全球变暖这一有害于人类

的重大环境问题。因此生物柴油是一种真正的绿色柴油。

同时,生物柴油也有它的缺点,主要为:价格太高;贮存性能差,易变质;粘度较高,在气候寒冷地区使用受到影响。

1.1.4 生物柴油原料的研究

生物柴油的油脂原料来自植物油脂(大豆油、玉米油、菜籽油、棕榈油等)、动物油脂(各种动物脂肪)、微藻脂肪酸以及废弃食用油(地沟油)等。

其中的植物油脂主要包括油菜籽、大豆、花生以及各种油料作物所提取的油脂,以油菜籽制取的生物柴油中不饱和脂肪酸甲酯含量较多(巫淼鑫等,2003)。目前,基因工程改造油菜籽已取得了初步的进展,这是因为油菜作为我国最主要的油料作物,它与模式植物拟南芥同属十字花科芸苔属,亲缘关系非常相近,拟南芥功能基因可直接应用于油菜的表达调控。目前利用油菜制造生物柴油技术已有较为成熟的生产工艺,特别是我国运用具有自主知识产权的“底物竞争”基因调控技术育成反义PEP“超油”油菜,大幅度提高了油菜含油量。由此可见,利用基因改良如油菜等油料作物进行生物柴油的生产将大有可为。

另外,利用木本油料植物制取生物柴油也发展很快。我国产油林木种类丰富,常见的产油林木有油棕、麻疯树、光皮树、油茶等,我国有很多科研单位正在相继开展这方面工作,其中建立了良种供应基地的有10种左右。这些产油林木可以大面积广泛种植,既营造了良好的生态环境,也带来了经济效益。

利用滩涂能源植物也能制取生物柴油。某些滩涂耐盐植物,如海滨锦葵、碱蓬和海蓬子的种子也富含油脂。在海滨滩涂盐碱地开展此类植物的种植栽培,有望为生物柴油的生产提供廉价的原料来源。

以植物油为原料生产生物柴油成本偏高,而将餐饮业废油脂进行回收生产生物柴油则是一个相对较好的方案(葛蕴珊等,2004)。既节省了能源,又使废物资源化,减少了污染。但餐饮废油脂是含有杂质的高酸值油脂,含有较多游离脂肪酸、聚合物、分解物等杂质,在酯交换反应之前,必须对其进行预处理,包括废油脂物理精炼和甲醇预酯化(孟凡清等,2003)。废弃动植物油脂在我国的生物柴油生产中也有应用,回收的废弃动植物油脂每年可生产约200万吨生物柴油(贾虎森等,2006)。但值得注意的是餐饮废油的利用存在资源总量有限,供应不稳定,原料组成及性能变化大等影响因素。

含油藻类是潜在的生物柴油生产原料。据报道异养培养小球藻(*Chlorella protothecoides*)的含油量可达藻体干重的57.2%，经快速热解可获得生物油（缪晓玲等，2003）。但微藻属于低等植物，在基因工程改造以及进行高密度培养等技术上还要克服很大的困难。国内外有许多科学家正在探索并研制“工程微藻”，希望能实现规模化养殖，降低成本，为获取油脂资源提供一条可靠的途径。

1.1.5 生物柴油制备方法

目前，生物柴油制备方法主要有直接混合法、微乳化法、高温裂解法和酯交换法。前两种方法属于物理方法，虽简单易行，能降低动植物油的黏度，但十六烷值不高，燃烧中积炭及润滑油污染等问题难以解决。高温裂解法过程简单，没有污染物产生，缺点是在高温下进行，需催化剂，裂解设备昂贵，反应程度难控制，且高温裂解法主要产品是生物汽油，生物柴油产量不高。工业上生产生物柴油主要方法是酯交换法。在酯交换反应中，油料主要成分甘油三酯与各种短链醇主要是甲醇在催化剂作用下发生酯交换反应得到脂肪酸甲酯和甘油。可用于酯交换的醇包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇和戊醇，其中最常用的是甲醇，这是由于甲醇价格较低，碳链短，极性大，能够很快与脂肪酸甘油酯发生反应。酯交换反应是可逆反应，过量的醇可使平衡向生成产物的方向移动，所以醇的实际用量远大于其化学计量比。反应所使用的催化剂可以是碱、酸或酶催化剂等，它可加快反应速率以提高产率。酯交换法包括酸催化、碱催化、超临界酯交换法和生物酶催化法。

直接混合法 在生物柴油研究初期，研究人员设想将天然油脂与柴油、溶剂或醇类混合以降低其黏度，提高挥发度。长期使用后常发生植物油变质、聚合和燃烧不完全现象。Amans等（1983）将脱胶的大豆油与2#柴油分别以1:1和1:2的比例混合，在直接喷射涡轮增压发动机上进行600h的试验。当两种油品以1:1混合时，会出现润滑油变浑以及凝胶化现象，而1:2的比例不会出现该现象，可以作为农用机械的替代燃料。Ziejewski（1983）将葵花籽油与柴油、红花油与柴油、大豆油与干洗溶剂油（48%石蜡和52%环烷）分别混合，虽然粘度有所下降，但长期使用仍会使进气阀积碳，并附着气缸盖和钢环上。在柴油中掺入95%的回收煎炸油，发现每运行4 - 4.5Km就必须更换润滑油，这是因为植物油的高黏度引起了不饱和成分的聚合使润滑油受到污染而变质。菜籽油与2#柴油分别以50: 50, 70: 30

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库